

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1971

THÈSE

37

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE
(DIPLOME D'ÉTAT)

par

Françoise, Annie BEAUJEAN née MIALARET

le 13 Avril 1944 à ALBI

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Dossier N° 917 L

Présentée et soutenue publiquement le :

CONSERVATION PAR CONGÉLATION DES HÉMATIES
UTILISATION EN CLINIQUE HUMAINE
ET EN LABORATOIRE

Président : Professeur Robert ANDRÉ

Médecin des Hôpitaux de Paris

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

Directeur du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Paris

Nº 917 L

par

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

— 2 —

— :: — :: — :: — :: — :: — :: — :: — :: — :: —

— 4 —

Président Professeur ROBERT ANDRE
Medecin des Hôpitaux de Paris
Professeur à la Faculté de Médecine
Directeur du Centre Départemental de Transfusion Sanguine

THÈSE

pour le

DIPLOME EN MÉDECINE

spécialité de

par

Monsieur, André DEBIEUX, DOCTEUR EN MÉDECINE

né le 13 avril 1944 à ALBI

docteur externe des hôpitaux de Paris

Présentée et soutenue publiquement le :



CONSERVATION DES CHARGES DES MÉTIERS
UTILISATION EN CLINIQUE MÉDICALE ET EN LABORATOIRE

Monsieur, Professeur ROBERT MATH

docteur des hôpitaux de Paris

Professeur à la Faculté de Médecine

Directeur du Centre d'Investigation de l'Université de Paris

UNIVERSITE DE PARIS VI
FACULTE DE MEDECINE SAINT-ANTOINE

-:-:-:-:-

Professeurs titulaires :

MM. ANDRE R.	Hématologie
BRISAUD H.	Pédiatrie
BROCARD R.	Médecine
BUGNARD L.	Biophysique
CAROLI J.	Médecine
CERBONNET G.	Chirurgie
CHERIGIE Ed.	Radiologie
CHIGOT P.L.	Chirurgie infantile
CONTE M.	Médecine
DAGUET L.	Bactériologie
DEBRAY J.	Médecine
FLABEAU F.	Chirurgie
GERBEAUX J.	Thérapeutique
GOSSET J.	Chirurgie
HUGELIN A.	Physiologie
LAPLANE R.	Pédiatrie
LELORIER G.	Obstétrique
LOEPER J.	Médecine expérimentale - Immunologie
LOYGUE J.	Chirurgie
MAROIS M.	Histologie
MERGER R.	Obstétrique
MILHAUD G.	Biophysique

MM.	NICK J.	Physiologie
	ORGEL L.	Anatomie Pathologique
	PERRAULT M.	Médecine
	POLONOVSKI Claude	Pédiatrie
	POLONOVSKI Jacques	Biochimie
	RICHET G.	Néphrologie
	WOLFROMM R.	Médecine

Professeurs sans chaire

-:-:-:-:-

MM.	CHALUT J.	Radiologie	MM.	LESTRADET H	Pédiatrie
Mme	CHAPUT A.	Stomatologie		PICARD J.	BIOCHIMIE
	GIRARD F.	PHYSIOLOGIE		ROUX Ch.	Embryologie
	GOLVAN Y.J.	Parasitologie			

Maîtres de Conférences

-:-:-:-:-

MM.	AKOUN G.	Médecine	MM.	GUIRAUDON G.	Anatomie
	ARDAILLOU R.	Physiologie		HERMAN D.	Médecine
	BAUX S.	Chirurgie		HUGUET Cl.	Chirurgie
	BITKER M.	Urologie		JACQUILLAT Cl.	Hématologie
	BOURY G.	Chirurgie		LASFARGUES G.	Pédiatrie
	BRICOUT F.	Bactério. Virol.		LEVY V.G.	Médecine
	CATINAT J.	Médecine		MALAFOSSE M.	Chirurgie
	CHEYMOL G.	Pharmacologie		MENSCH B.	Biophysique
	CHOUARD Cl.	O.R. L.		MERY J. Ph.	Néphrologie
	CLOAREC M.	Médecine	Mme	MIGNON Fr.	Néphrologie
	CONTAMIN F.	Médecine		PIERON R.	Médecine
	COSCAS G.	Ophthalmologie		POULET J.	Médecine
	DAUTRY P.	Chirurgie		RAMPINI Cl.	Biochimie
	DELIGNE P.	Anesthésiologie		RICHARDET J.M.	Pédiatrie
	DOYON D.	Radiologie		ROLAND J.	Anatomie Pathologique
	DRY J.	Médecine		SALAT J.	Obstétrique
	DUHAMEL G.	Hématologie		SALMON Ch.	Hématologie
	FOUET P.	Thérapeutique		SANTARELLI J.	Obstétrique
	GAUTIER H.	Physiologie		WARGON H.	Médecine expéri.
	GUILMET Cl.	Anesthésiologie		WEINMANN S.	Biochimie.

ENSEIGNANTS ASSOCIES

-:-:-:-:-

M.C.A. Associé - M. ELIAKIS Em. Médecine Légale

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

-:-:-:-:-

A mon Mari

A ma Famille

A Mon Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur Robert ANDRE

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris,

Médecin des Hôpitaux de Paris,

Directeur du Centre Départemental de Transfusion Sanguine de Paris,

Chevalier de la Légion d'Honneur.

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la
présidence de cette thèse.

Qu'il trouve, ici, l'expression
de ma respectueuse reconnaissance.

A Madame le Docteur Anne-Geneviève COMBRISSE
Maître de Conférence Agrégé
Biologiste des Hôpitaux.

Qui m'a guidée avec sollicitude tout au long
de mon apprentissage et qui m'a inspiré ce
travail.

En témoignage de tout mon respect
et de toute mon affection.

A Madame le Docteur F. COURTOIS

A Monsieur le Docteur D. HOUSSAY

En remerciements pour leurs précieux conseils

Avec toute ma sympathie.

A Madame N. BRUSSEL

Pour sa gentillesse et pour son aide efficace.

Avec toute mon amitié

A Madame C. PANNETIER

Qui a contribué largement à ce travail.

Avec tous mes remerciements

A Mesdames A. CHAMPCOMMUNAL

D. FRAVAL

L. POT

A. HONNORAT

G. ZANELLI

Mesdemoiselles F. REAUBOURG

F. REGNAULT

A. LEPAGE

E. CADET

G. GREGOIRE

M. RETRU

F. TRIBOULET

Monsieur B. PLANAT

Avec toute mon amitié.

Au Docteur MANNONI
et au Docteur CARRERE

Avec toute mon amitié.

- INTRODUCTION -

Le but de ce travail est d'étudier la conservation des hématies par congélation.

Un bref historique de la transfusion va nous permettre de replacer les problèmes de conservation prolongée des hématies dans l'évolution générale transfusionnelle.

Quand Karl LANDSTEINER découvre en 1900 les 4 groupes fondamentaux des érythrocytes humains A.B. AB et O, la transfusion devient pour la première fois possible. Encore exceptionnelle, elle se pratique directement de bras à bras.

La guerre de 1914-1918 va en montrer l'intérêt car des milliers de blessés sont alors sauvés par la thérapeutique transfusionnelle.

Il faut attendre les travaux d'Emile JENBREAU sur le citrate de soude pour prélever et conserver du sang sur anticoagulant.

En 1928, le premier Centre de Transfusion est fondé à Paris par Arnault TZANCK.

Jusqu'en 1940 les progrès sont lents. Mais la deuxième guerre mondiale entraîne un nouvel essor de la transfusion : Le nombre de flacons délivrés dans la région parisienne passe de 262 en 1930 à 10 000 en 1945.

Parallèlement à l'augmentation des demandes, la technologie du prélèvement et de la conservation du sang se modernise : En 1945 apparition de la solution anticoagulante de WURMSER permettant une conservation du sang de quelques jours à +4° C. Plus tard en 1956, la solution anticoagulante A.C.D est introduite en France. Utilisée à l'heure actuelle, elle permet un délai de conservation de 21 jours du sang à +4° C.

A mesure que se crée une organisation transfusionnelle générale, la recherche immunologique se développe et conduit à la découverte de nombreux systèmes de groupes sanguins : Système Rhésus découvert en 1946, puis plus récemment systèmes MNSs, P, Luthéran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd, Kiégo, Sutter, I, Auberger, Xg, Vel, Yt, Ge...

Les études des phénotypes érythrocytaires font apparaître chez certains sujets des combinaisons antigéniques peu fréquentes parfois même rares.

La durée de conservation du sang limitée à 21 jours ne rend pas possible la formation de réserves de sangs rares typés dans les différents systèmes de groupes sanguins et ne permet pas de fournir toujours une quantité suffisante de sang compatible.

Des méthodes de conservation par congélation, permettant une survie prolongée de quelques mois à quelques années des hématies, ont été mises au point dans de nombreux pays étrangers.

Au Centre Départemental de Transfusion Sanguine de la Seine, deux méthodes de congélation des hématies ont été étudiées :

- La première, de pratique courante depuis 1968, nous a permis de constituer une réserve de sangs rares.

- La deuxième, plus récente, est à l'heure actuelle uniquement appliquée à la congélation d'hématies-tests.

Dans la première partie de ce travail, nous exposerons ces 2 méthodes avec les résultats obtenus.

La deuxième partie sera consacrée à une confrontation de ces résultats à ceux de la littérature.

- M E T H O D E S -

I - METHODE DE CONSERVATION DES HEMATIES PAR CONGELATION

A -80° EN PRESENCE DE GLYCEROL.

- Cette technique, mise au point en 1968, utilise le glycérol comme agent protecteur intra-cellulaire.
- C'est une méthode de congélation lente, sans contrôle de vitesse de refroidissement.
- Il s'agit d'un procédé simple utilisable à l'heure actuelle dans tous les centres de transfusion.

Matériel, Réactifs, Méthodes (5,8)

1° Matériel.

- Une centrifugeuse réfrigérée susceptible de centrifuger ensemble plusieurs flacons de 500 millilitres de sang.
- Un congélateur dont la température peut être maintenue entre -85 et -90° C.

2° Réactifs.

- Réactifs utilisés pour la glycérolation :

- Solution n° 1 :

Glycérol à 25 % (poids/volumes).

Glycérol bidistillé pur..... 250 g

Diluant Aq.s.p 1 000 ml

- Solution n° 2 :

Glycérol à 50 % (poids/volume).

Glycérol bidistillé pur..... 500 mg

Diluant Aq.s.p.1 000 ml

- Diluant A :

Sorbitol à 4 %

Sorbitol..... 40 g
ClNa à 0,9 %.....q.s.p.1 000 ml

- Réactifs utilisés pour la déglycérolation :

- Solution n° 3 :

Glycérol à 10 % (poids/volume)
Glycérol bidistillé pur..... 100 g
Diluant Bq.s.p.1 000 ml

- Solution n° 4 :

Sorbitol à 16 %
sorbitol..... 160 g
ClNa à 0,9 %q.s.p.1 000 ml

- Soluté stérile apyrogène de ClNa à 0,9 % en H₂O.

- Diluant B : Sorbitol à 16 %. C'est la solution n° 4 qui sert de diluant pour la solution n° 3.

3° Méthodes.

- Résistance globulaire aux solutions salées hypotoniques : technique de J.V. Dacie (10)

- Dosage de l'hémoglobine plasmatique :

- Technique de W.H. Crosby et F.W. Furth (9) pour les concentrations égales ou inférieures à 50 mg pour 100 ml.

Pour les concentrations supérieures à 50 mg pour 100 ml, mesure spectrophotométrique de la densité optique de l'échantillon dilué à l'aide de carbonate de sodium à 0,1 % à la longueur d'onde de 540 mμ. Courbe d'étalonnage établie à partir de solutions étalons d'oxyhémoglobine diluées en carbonate de sodium à 0,1 %.

- Dosage du glycérol et du sorbitol (méthode personnelle).

L'ensemble des manipulations décrites ci-dessous doit être exécuté sur les solutions étalons de polyalcools dans l'eau distillée comme sur les échantillons d'hématies glycérolées.

Les échantillons à tester sont dilués avec de l'eau distillée, de façon que les concentrations finales du ou des polyalcools soient comprises entre 0,5 et 4,5 grammes par litres.

Cette dilution entraîne l'hémolyse des hématies ; l'hémolyse peut être complétée, quand cela est nécessaire, par congélation et décongélation de la suspension.

Le dosage est effectué sur deux ou trois essais de l'échantillon dilué et sur un essai d'eau distillée qui servira de référence pour la colorimétrie.

L'élimination des protéines et des citrates peut se faire à température ambiante, mais l'oxydation des polyalcools ainsi que la mesure du formaldéhyde doivent avoir lieu à 4° C, de préférence dans une paillasse réfrigérée ; la verrerie et les réactifs sont amenés à cette température avant le début du travail.

La méthode de dosage comporte trois stades :

- 1° Elimination des protéines et des citrates.
- 2° Oxydation des fonctions alcools primaires en formaldéhyde.
- 3° Dosage du formaldéhyde.

a) Elimination des protéines et des citrates

Dans un tube à centrifuger, mettre successivement 0,5 ml de la solution diluée (ou d'eau distillée pour le témoin), 3,5 ml de réactif alcoolique de Vaughn. Boucher le tube et agiter toutes les 3 minutes. Au bout de 10 minutes, ajouter 0,5 ml de solution d'hydroxyde de baryum, boucher, attendre 10 minutes en agitant de temps en temps. Ajouter alors au mélange 0,5 ml de solution de sulfate de magnésium à 5 %. Boucher les tubes, agiter et, 10 minutes plus tard, centrifuger à 1 500 g pendant 10 minutes. Pipeter dès la fin de la centrifugation la moitié du liquide surnageant et le refroidir à 4° C.

b) Oxydation du glycérol et du sorbitol :

L'oxydation, par l'acide périodique, des fonctions alcools primaires des 1-2 dialcools libère du formaldéhyde. Ainsi pour le glycérol :



Dans un tube à essai, mettre successivement : 1,5 ml d'eau distillée, 0,8 ml d'acide sulfurique N, 0,5 ml de surnageant, puis 0,2 ml d'acide périodique 0,2 M. Agiter. Attendre exactement 20 minutes après l'addition d'acide périodique pour ajouter 0,4 ml de solution de méta-arsénite de sodium.

Une coloration brune localisée apparaît au bout de 3 à 10 minutes. Agiter. La solution redevient incolore en moins de 3 minutes.

c) Dosage et formaldéhyde.

Dans la solution incolore, ajouter 2 ml de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 % et, immédiatement après, 0,5 ml de ferricyanure de potassium à 5 %. Bien mélanger 20 minutes exactement après l'addition de chlorhydrate de phénylhydrazine, verser lentement sans cesser d'agiter, 5 ml d'acide chlorhydrique 4 N. Les solutions virent du brun-orangé au magenta. 5 minutes exactement après l'addition de l'acide chlorhydrique ajouter 5 ml d'éthanol absolu. Agiter et laisser reposer 5 minutes à la température ambiante. Mesurer la densité optique par rapport au blanc de référence à la longueur d'onde de 520 mμ.

d) Résultats. - Les courbes d'étalonnage. -

Les courbes d'étalonnage sont établies à partir des résultats des dosages effectués sur des solutions aqueuses de concentrations connues de glycérol et du sorbitol. En portant, sur papier millimétré, en abscisse les concentrations et en ordonnée les densités optiques, on peut tracer des droites passant par l'origine dont la pente est caractéristique du polyalcool étudié.

Nous avons vérifié que la densité optique mesurée pour une solution de glycérol et de sorbitol est égale à la somme des densités optiques dues à chacun des constituants.

- Calcul des résultats.

Le dosage est effectué sur trois dilutions différentes du même échantillon à tester et sur 2 ou 3 essais de chaque dilution. On trace la droite passant par l'origine et les points expérimentaux. On repère sur cette droite une densité optique moyenne correspondant à une dilution déterminée de l'échantillon à tester.

La concentration en glycérol ou en sorbitol correspondant à cette densité optique est lue sur la courbe d'étalonnage. Il ne reste plus qu'à multiplier la concentration lue par l'inverse de la dilution pour obtenir la concentration de l'échantillon étudié.

- Mesure de la viabilité des hématies marquées par le radiochrome 51.

Deux millicuries de radiochrome de sodium sont ajoutées stérilement dans un flacon contenant environ 250 ml de sang partiellement déplasmatisé.

Après incubation d'une heure à 4° C, on procède à toutes les manipulations préalables à la congélation.

Le flacon d'hématies congelées à -87° C est décongelé au bout d'une semaine. On effectue alors les opérations de lavage. Puis les hématies sont resuspendues dans leur plasma d'origine.

Dix centimètres cubes de sang marqué sont injectés après épreuves de compatibilités à des receveurs n'ayant pas eu de grossesses, n'ayant jamais reçu de transfusions de sang, et ne présentant aucun signe clinique ni biologique d'hémorragie ni d'hémolyse.

La radioactivité du sang du receveur est mesurée sur des prélèvements de sang effectués 8 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 24 heures, 2 jours, 3 jours et 5 jours après l'injection.

On trace la courbe de disparition de la radioactivité circulante en portant en abscisse le temps et en ordonnée logarithmique la radioactivité.

Quand il n'existe aucune hémolyse précoce, la radioactivité circulante par unité de volume est identique, aux erreurs statistiques près, dans les trois premiers échantillons prélevés dans la demi-heure qui suit l'injection. On calcule dans ce cas le volume érythrocytaire total et l'on apprécie le volume sanguin ainsi que le volume plasmatique en fonction du volume érythrocytaire total et de l'hématocrite somatique moyen. Les valeurs observées correspondant habituellement, à 10 % près aux valeurs théoriques normales du receveur.

Quand les volumes mesurés diffèrent des volumes théoriques normaux, ou si la radioactivité décroît exponentiellement au cours de la première demi-heure, le volume sanguin du receveur est mesuré au cinquième jour à l'aide d'une injection d'hématies autologues fraîches marquées par le radiochromate.

La connaissance du volume érythrocytaire vrai et de la radioactivité totale injectée permet le calcul de la radioactivité circulante initiale théorique 100 % en l'absence d'hémolyse. Habituellement, celle-ci est analogue à celle observée au cours de la première demi-heure en cas de stabilité ou voisine de celle que l'on peut déterminer par extrapolation au temps 0 des valeurs constatées à 9, 15, 30 minutes après l'injection.

Le taux de viabilité de la 24e heure est égal au rapport entre la radioactivité circulante à la 24e heure et la radioactivité théorique initiale au temps 0.

Après la 24e heure, la disparition des hématies encore en circulation est semblable à celle des hématies fraîchement prélevées, comme le montre la pente du segment de droite représentant la baisse de la radioactivité au cours des cinq premiers jours.

Nous considérons que la viabilité initiale est satisfaisante si plus de 70 % de la radioactivité injectée est présente sur les hématies circulantes 24 heures après l'injection.

- Etude des antigènes érythrocytaires (7)

Les anticorps suivants ont été utilisés pour l'étude qualitative des phénotypes érythrocytaires.

- Anti A - anti B - anti A + B - anti H - anti I
- Anti M - anti N - anti S - anti s
- Anti Tja - anti P₁
- Anti D - anti c - anti C^w - anti c - anti E - anti e
- Anti K - anti k - anti Kp^a - anti Kp^b
- Anti le^a - anti le^{bh}
- Anti Fy^a - anti Fy^b - anti JK^a - anti Lu^a

Etude quantitative des antigènes ABH, I et i

On met en présence un anticorps spécifique d'un antigène donné dont on connaît la concentration et une suspension des hématies à tester, contenant 200 000 hématies par mm³, dans des conditions constantes de temps et de température.

- Mesure des activités enzymatiques érythrocytaires

Cinq enzymes sont étudiées :

La Pyruvate kinase, la phosphatase acide, la phospho-gluconutase, l'adénylate-kinase et la glucose 6 phosphate déshydrogénase.

Pour la G-6-P-D et la pyruvate-kinase, des méthodes spectrophotométriques ont été utilisées pour mesurer quantitativement leur activité.

La phosphatase acide, la phospho-glucomutase et l'adénylate-kinase ont été étudiées par méthodes électrophorétiques.

Technique de conservation par congélation (5)

La mise au point de la méthode a été effectuée sur des flacons de sang prélevé sur mélange anticoagulant A.C.D. (N.I.H. formule A) à des malades atteints d'hémochromatose. La possibilité d'obtenir pendant des mois, toutes les semaines ou tous les quinze jours un flacon de 400 ml de sang du même donneur a grandement simplifié les travaux préliminaires.

Les essais cliniques ont été réalisés à l'aide de sang prélevé à des donneurs bénévoles en bonne santé apparente au Centre Départemental de Transfusion Sanguine de la Seine.

Le sang a été recueilli le plus souvent dans des flacons de verre, quelquefois dans des doubles sacs en matière plastique.

1° Glycérolation des hématies.

Toutes les manipulations sont effectuées à 4° C en respectant les précautions habituelles d'aseptie.

a) le plasma surnageant après centrifugation ou après sédimentation spontanée est recueilli stérilement et conservé à -85° C.

b) le flacon de globules rouges est placé sur un agitateur dans une armoire réfrigérée. On laisse couler en goutte à goutte, dans les hématies, 250 ml de solution de glycérol à 25 % (solution n°1). Cette première addition de glycérol se fait en 5 à 10 minutes.

c) le flacon est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 1 500 g et à 4° C. Le surnageant est recueilli aseptiquement.

d) le flacon d'hématies est de nouveau placé sur l'agitateur dans l'armoire réfrigérée. On ajoute en goutte à goutte 250 ml de solution de glycérol à 50 % (solution n°2). L'addition du glycérol demande 10 à 15 minutes.

e) Le flacon est centrifugé pendant 45 minutes à 1 500 g. Le surnageant est recueilli aseptiquement.

f) Le flacon est de nouveau placé sur agitateur et l'on ajoute 250 ml de solution de glycérol à 50 %. Cette nouvelle addition de glycérol se fait en 10 à 15 minutes. Le flacon est prêt pour la congélation.

2° Congélation des hématies.

Le flacon de verre et son contenu sont mis dans un congélateur dont la température est fixée entre -85° et -90° C. La congélation s'effectue lentement sans aucun contrôle de vitesse. Le verre résiste bien à cette température, à condition que le flacon ne soit pas rempli à plus des 4/5 de sa capacité. On peut, si on le préfère, transvaser le contenu du flacon dans un sac en matière plastique d'une contenance de 600 à 1 000 ml. Le plastique étant fragile à -85° C, on a intérêt à recueillir le sac à l'aide d'une feuille d'aluminium avant la congélation.

3° Décongélation des hématies.

Quelques jours ou quelques mois plus tard, le flacon est retiré du congélateur. Il est déposé de préférence sur une planche de bois recouverte d'une bonne épaisseur de papier absorbant. Cette précaution est recommandée pour éviter que le fond du flacon ne se détache à l'apporte-pièce au cours du réchauffement. Le flacon est laissé une heure à la température ambiante.

Au bout de ce laps de temps, il est placé dans un bain-marie à 30° C. La décongélation, hâtée par une agitation douce, est complète en 15 minutes environ.

4° Déglycérolation des hématies.

Si le sang a été conservé dans une poche en matière plastique, on le transvasera de nouveau dans un flacon de verre après décongélation.

a) Le flacon d'hématies décongelées est centrifugé pendant 45 minutes à 1 500 g à 4° C.

b) Dans l'armoire réfrigérée, on remplace le surnageant par 250 ml de solution de glycérol à 10 % (solution n° 3 où le glycérol est dilué par du sorbitol à 16 % en ClNa à 0,9 %). L'addition se fait comme précédemment, en goutte à goutte sous agitation constante.

c) Le flacon est de nouveau centrifugé 30 minutes à 1 500 g. Le surnageant est remplacé par 250 ml de solution de sorbitol à 16 % (solution n° 4).

d) Le flacon est encore centrifugé deux fois 15 minutes à 1 500 g. Le surnageant est remplacé chaque fois par 250 ml de soluté salin physiologique.

e) Après une dernière centrifugation, le surnageant peut être remplacé par le plasma d'origine décongelé. Si les hématies doivent être injectées immédiatement, on peut se dispenser d'ajouter le plasma.

La glycérolation demande environ 2 heures et demie, la décongélation et la déglycérolation exigent au moins 4 heures de travail. Il convient de souligner toutefois qu'il faut le même laps de temps pour traiter six flacons ou un seul. Nous considérons qu'une technicienne expérimentée peut glycéroler aisément six flacons d'hématies dans sa matinée et déglycéroler six autres flacons dans son après-midi.

La méthode nous paraît donc adaptée à la conservation des globules rouges de phénotypes rares, dont la demande est actuellement inférieure à six flacons par jour dans la plupart des Centres de Transfusion.

Cette méthode de congélation peut aussi s'appliquer à la conservation d'hématies-tests (7). La glycérolation des hématies se fait selon un processus identique à celui utilisé pour la conservation de flacons destinés aux transfusions.

Les globules glycérolés sont ensuite répartis soit dans des tubulures en matière plastique, divisées par des clips métalliques en segments de 5 à 10 cm, dans des paillettes en chlorure de polyvinyle, soit dans des tubes en verre pyrex résistant à -85°.

La décongélation :

Le tube, le segment de tubulure ou la paillette est sorti du congélateur. Le tube est laissé à température ambiante, la paillette ou la tubulure placée d'emblée à un tube à centrifuger dans lequel elle se vide au cours de la décongélation.

La décongélation spontanée à la température ambiante est complète en 3 minutes.

La déglycérolation :

Si le volume des hématies dans le tube est inférieur à 2 ml, on ajoute lentement une quantité suffisante de solution de glycérol à 25 % de manière à obtenir un volume de 2 ml environ. Puis au goutte à goutte, 2 ml de solution de glycérol à 10 % en sorbitol 16 % sont ajoutés. Bien mélanger avec douceur. Centrifuger 5 mn à 2 200 R.P.M. et rejeter le surnageant.

On ajoute 2 ml de glycérol à 10 % en goutte à goutte, on mélange doucement - Centrifuger 4 mn à 2 200 R.P.M. Le surnageant est pipeté.

Ajouter 2 ml de sorbitol 16 % en goutte à goutte, bien mélanger - Centrifuger 3 mn à 2 200 R.P.M. On rejette le surnageant.

Ajouter 2 ml de NaCl à 0,9 % - Bien mélanger - Centrifuger 2 mn à 2 200 R.P.M. Pipeter le surnageant.

Ajouter autant de NaCl à 0,9 % que le tube peut en contenir. Centrifuger 2 mn à 2 200 R.P.M. Pipeter le surnageant. 2 à 3 lavages en NaCl à 0,9 % seront effectués selon la coloration du surnageant.

Les hématies seront remises en suspension dans le milieu approprié à la concentration désirée.

Résultats

Un flacon de sang décongelé et reconstitué ne diffère pas extérieurement d'un flacon de sang conservé à 4° C selon la méthode habituelle.

1° Etude des hématies.

Les hématies dans le sang reconstitué avec leur plasma après décongélation.

L'aspect des hématies à l'état frais et sur les frottis colorés paraît normal. Les réticulocytes sont retrouvés, après coloration par le bleu de méthylène nouveau, dans la même proportion que dans le sang frais.

Les hématies sont cependant plus petites que dans le sang d'origine. En effet, le volume globulaire moyen des hématies dans le sang prélevé sur A.C.D. est, pendant les 15 premiers jours de conservation à 4° C. de 124 μ^3 (moyenne de 59 mesures). Après décongélation et lavage des hématies, quelle qu'ait pu être la durée de conservation à 4° C avant la congélation (0 à 18 jours dans notre étude), le volume globulaire moyen est voisin de 104 μ^3 (moyenne de 66 mesures).

La résistance globulaire aux solutions salines hypotoniques est légèrement diminuée.

La viabilité des hématies marquées par le radiochrome 51 est satisfaisante. Vingt-quatre heures après l'injection de 10 millilitres d'hématies radiochromées, nous avons retrouvé, dans le sang circulant des quatre receveurs, respectivement : 86, 87, 96 et 96 % de la radioactivité totale injectée.

La disparition de la radioactivité **circulante** en fonction du temps a été étudiée pendant 5 jours. Le délai est évidemment trop bref pour déterminer avec précision le temps nécessaire à la décroissance de 50 % de la radioactivité **circulante**. Cependant, les résultats observés sont compatibles avec une survie normale des hématies injectées : T 1/2 du radiochrome circulant : 28 ± 4 jours.

Etude des phénotypes érythrocytaires des groupes sanguins (7)

Tous les antigènes érythrocytaires testés dans les différents systèmes de groupes sanguins sont facilement décelables après décongélation quelque soit la durée de conservation (expériences sur échantillons conservés pendant 1 à 2 ans.)

L'étude quantitative des Antigènes ABH, I et i ne montre aucune modification entre hématies congelées à -80° C puis décongelées et hématies fraîches.

Les enzymes érythrocytaires étudiés ne montrent aucune anomalie ni dans leur activité ni dans leur structure.

2° Rendement de la méthode.

Le rendement de la méthode se traduit par le rapport entre les quantités initiales et terminales de globules rouges. Il est très difficile, en raison des variations de volume des hématies, de mesurer le rendement avec précision.

La méthode la plus simple, sinon la plus exacte, de calculer le rendement de la préparation, consiste à faire la somme de l'hémoglobine éliminée dans les différents surnageants et à comparer cette somme à la quantité totale d'hémoglobine présente dans le sang à l'origine.

Pendant la glycérolation, on n'observe aucune hémolyse. Les taux d'hémoglobine dans les surnageants après centrifugation sont inférieurs à 25 mg pour 100 ml.

Après décongélation, le taux d'hémoglobine dans le liquide de suspension varie de 170 à 450 mg pour 100 ml. Il ne semble pas que ces variations soient dues à des différences dans les modalités techniques. En effet, on constate des résultats analogues avec le sang d'un même donneur à des mois d'intervalles, et des résultats différents avec le sang de deux donneurs traités le même jour dans les mêmes conditions. Le sang de quinze donneurs atteints d'hémochromatose est réservé régulièrement pour essais de congélation depuis plus de trois ans. Le sang de dix d'entre eux présente toujours un taux très faible d'hémolyse, le sang de cinq autres une hémolyse constamment plus élevée.

Les différences de comportement des hématies apparemment normales au cours du processus de congélation-décongélation sont voisines de celles qu'observent les spécialistes de congélation de semence de taureaux. Selon R. CASSOU, le sperme de certains reproducteurs, en dépit de la grande richesse qualitative et quantitative de l'éjaculat frais, supporte mal le traumatisme de congélation-décongélation. Aucune explication de ce phénomène n'est proposée.

A chaque lavage successif, on retire une quantité décroissante d'hémoglobine. Lors de la remise en suspension des hématies dans le plasma, on note habituellement une augmentation modérée du taux de l'hémoglobine. La quantité d'hémoglobine dans le plasma avant l'injection est comprise entre 70 et 200 mg pour 100 ml.

Le rendement global de la méthode est supérieur à 95 %.

3° Influence du délai de conservation à 4° C du sang avant congélation.

Nous avons observé des résultats identiques à tous égards, en traitant du sang fraîchement prélevé ou du sang conservé pendant 8 jours à 4° C.

Cette constatation revêt un certain intérêt : en effet, dans un Centre de Transfusion, on ne connaît pas toujours à l'avance les phénotypes érythrocytaires des donneurs. L'un d'eux peut se révéler précieux au bout de quelques jours de recherches. Il est donc utile de savoir qu'un délai de conservation d'une semaine ne rend pas le flacon de sang impropre à la congélation.

Par contre, un délai de conservation supérieur à 10 jours à 4° C peut être préjudiciable. Nous avons régulièrement noté une légère hémolyse à la glycérolation puis une hémolyse importante à la décongélation, quand le sang avait plus de 10 jours de conservation avant le traitement. Toutefois, le rendement global est de 90 % environ, ce qui pourrait être encore acceptable si des études de viabilité in vivo venaient confirmer la valeur des hématies traitées dans ces conditions.

4° Comportement du sang décongelé et reconstitué, pendant une conservation secondaire à 4° C.

Il importe de pouvoir conserver pendant quelques jours à 4° C un flacon de sang décongelé et reconstitué si l'en doit l'expédier, par avion ou par chemin de fer, à un destinataire éloigné.

Des études sont actuellement en cours dans le laboratoire pour préciser dans quelle mesure le sang reconstitué peut être conservé à 4° C avec toutes garanties de stérilité et de viabilité cellulaire.

Nous nous sommes bornés jusqu'à présent à observer quatre flacons de sang reconstitué pendant 8 jours : macroscopiquement, rien d'anormal n'a été noté. L'hématocrite est resté stable. Le taux de l'hémoglobine ne s'est élevé que modérément.

5° Dosage du glycérol au cours des manipulations.

Théoriquement, après trois glycérolations successives, si l'on ajoute à chaque opération un volume de solution de glycérol égal à celui du culot érythrocytaire, la concentration finale intracellulaire du glycérol devrait être voisine de 40 %. En réalité, la partie de volume n'est jamais atteinte.

Des dosages de glycérol effectués tant sur le surnageant que sur la suspension d'hématies glycérolées avant congélation ou après décongélation, on peut déduire que la concentration intracellulaire du polyalcool varie entre 32 et 37 %.

Nous avons pu montrer que la vitesse de passage du glycérol à travers la membrane érythrocytaire est très rapide : dans nos conditions expérimentales, des concentrations intra et extra-cellulaires identiques de glycérol sont toujours atteintes avant congélation des hématies.

Après lavage et remise en suspension dans le plasma, le taux de glycérol varie de 0,6 à 2 g par litre dans le sang reconstitué.

6° Utilisation clinique des hématies conservées par congélation (26)

Au début, trois grandes indications transfusionnelles se sont dégagées pour l'utilisation des hématies congelées :

a) Transfusion de sujets de groupes sanguins rares : en phénotypes érythrocytaires

- D⁺/D⁺ - Bh - Tj(a -)

b) Cas de receveurs multitransfusés qui présentent des mélanges d'anticorps tels que la fréquence des donneurs compatibles devient de plus en plus restreinte.

Observations étudiées au C.D.T.S

- Anti D + C + K + Fy^a

- Anti e + JK^b

- Anti D + S + Fy^a = Lu^a etc...

c) Sujets atteints d'anémie hémolytique auto-immune avec auto-anticorps de type YG à spécificité anti e.

L'utilisation de flacons de sang R₂ R₂ est alors nécessaire.

Ces motivations immunologiques nous ont conduit à constituer une réserve de flacons conservés à -80° en présence de glycérol.

Les 2 tableaux qui suivent, montrent d'une part l'état actuel de la réserve de flacons de groupe rare du C.D.T.S. (tableau II) et d'autre part le nombre de flacons des hématies conservées de phénotypes utiles en cas de sujets poly-immunisés (tableau III).

TABLEAU II

PHENOTYPES		NOMBRE DE FLACONS
Oh	Om ^h Rh positif	6
	O ^h Rh négatif	4
	B ^h Rh positif	1
O Tj(a -)	Rh positif	3
O Luke -	Rh positif	3
A ₁ DcE/D -		1
A ₁ D - -/D- -		2
O D(C) -/D(C) -		1
O KK	Rh positif	4
O KK	Rh négatif	4
O Kp(b -)	Rh positif	2
O Kp(b -)	Rh négatif	1
O Fy(a-b-)	Rh négatif	3
O Vel -	Rh positif	4

PHENOTYPES			NOMBRE DE FLACONS
O	cc DEE		6
A	cc DEE		9
O	cc DEE	Fy(a -) Jk(a -) Le(a -)	1
A	cc DEE	Fy(a -) Jk(a -) Le(a -)	2
O	ccdde K -	Fy(a -) - Jk(a -) Le(a -)	10
A	ccdde K -	Fy(a -) - Jk(a -) Le(a -)	9
O	CCDee K -	Fy(a -) - Jk(a -) Le (a -)	10
A	CCDee K -	Fy(a -) - Jk(a -) Le (a -)	10
O	CcDee K -	Fy(a -) - Jk(a -) Le (a -)	8
A	CcDee K -	Fy(a -) - Jk(a -) Le (a -)	4

De nombreuses transfusions ont ainsi été faites avec des hématies congelées et décongelées par notre méthode.

Il n'est pas possible d'étudier avec précision la viabilité des hématies injectées. Mais les résultats cliniques ont toujours été satisfaisants et il y a dans chaque cas : amélioration des données numériques de la numération globulaire, de l'hématocrite et de l'hémoglobine après la transfusion.

D'autres indications semblent se dégager à l'heure actuelle. La diminution considérable du risque de transmission de l'hépatite ictérogène, l'absence d'apport de leucocytes et de plaquettes, la faible teneur du potassium intra-globulaire, autant de facteurs qui étendent l'utilisation du sang congelé en pathologie.

CONCLUSION :

Nous venons de décrire une méthode de conservation des hématies par congélation.

C'est un procédé de congélation lente, utilisant le glycérol comme agent protecteur intra-cellulaire.

La technique est applicable aux flacons de sang destinés aux transfusions et aux hématies-tests.

Les résultats obtenus montrent :

Un rendement de la méthode supérieur à 95 %.

Les globules après décongélation apparaissent normaux et doués de toutes leurs fonctions essentielles.

Le délai de conservation des hématies congelées par cette méthode semble illimité (expériences sur plusieurs années).

Les transfusions faites avec du sang ainsi traité se sont montrées efficaces et sans danger.

METHODE DE CONSERVATION DES HEMATIES-TESTS PAR CONGELATION EN AZOTE LIQUIDE

Un laboratoire d'Immunologie se doit de posséder en permanence :

- Des hématies de phénotypes exceptionnels : Bombay - Tj(a -) etc... afin de pouvoir identifier un anticorps correspondant à un antigène de grande fréquence (ex : anti H ou anti Tja)
- des hématies de combinaisons phénotypiques variées afin d'identifier des mélanges d'anticorps chez des sujets polytransfusés.

La méthode de congélation pour hématies-tests que nous présentons n'est pas originale dans son principe.

Nous avons adapté à nos conditions de travail, la technique préconisée par BOUILLENE (1) elle-même dérivée de la méthode de KRIJNEN (17,18).

Elle utilise la congélation en azote liquide et emploie le glycérol comme protecteur cellulaire.

Du point de vue technologique, elle bénéficie des travaux de R. CASSOU (2,3) sur la conservation de semences animales.

Matériel - Réactif - Méthode

1 - Matériel

Cuves remplies d'azote liquide, de contenance variable. (Le stockage d'échantillons de 200 sujets correspond approximativement à une cuve de 300 litres).

Le niveau d'azote dans la cuve est régulièrement surveillé : il doit être stable et ne varier que de 1 à 3 cm.

L'intérieur est aménagé avec des canisters en nombre correspondant à la capacité de la cuve.

Paillettes : petits tubes en chlorure de polyvinyle de capacité : 0,5 ml (longueur : 133 mm - Diamètre : 2,5 mm).

De différentes couleurs.

On les bouche à l'aide d'une poudre d'alcool polyvinylique qui se transforme en gel étanche, au contact de l'humidité.

Le remplissage des paillettes s'effectue avec :

- une pompe à vide
- un peigne d'aspiration de une ou plusieurs broches
- d'un faisceau permettant de maintenir plusieurs paillettes entre elles et ainsi de faciliter un remplissage simultané à l'aide du peigne approprié.

Gobelets plastiques terminés par une tige métallique permettant de sortir facilement le gobelet de l'azote, manuellement ou à l'aide d'une pince.

Trois gobelets superposés font la hauteur d'un canister.

Cela nous détermine 3 niveaux : niveau supérieur, moyen et inférieur.

A chaque niveau correspond un plan détaillé de la cuve qui nous permet ainsi de repérer immédiatement la place de nos échantillons.

Un réfrigérateur réglé à +4° C.

Une centrifugeuse si possible réfrigérée, avec dispositifs permettant de faire tourner des flacons de 25 ml ou des tubes à hémolyse.

Un réipient (cuvette en plastique ou cristalliseur), qui contiendra un bain d'eau à 40° C.

2 - Réactifs

Réactifs utilisés pour la congélation :

- Glycérol à 40 %

glycérol bidistillé pur..... 400 gr

diluant A.....q.s.p.....1 000 ml

diluant A : Sorbitol à 4 %

- sorbitol..... 40 gr

NaCl 0,9 %q.s.p.....1 000 ml

Réactifs utilisés pour la déglycérolation :

- Glycérol à 10 %

glycérol bidistillé pur..... 100 gr

Diluant B q.s.p..... 1000 ml

- Sorbitol à 8 %

sorbitol..... 80 gr

NaCl 9‰q.s.p..... 1000 ml

- Diluant B

Sorbitol..... 160 gr

NaCl 0,9 %q.s.p..... 1000 ml

Soluté stérile apyrogène de NaCl 9‰ en H₂ O. Tous ces réactifs sont refroidis au préalable avant toute manipulation.

3 - Méthodes d'étude

Résistance globulaire aux solutions salées hypotoniques : technique de J.V. DACIE (10).

Dosage de l'hémoglobine plasmatique :

Pour les concentrations égales ou inférieures à 50 mg pour 100 ml : technique de W.H. CROSBY et FURTH (9).

Pour les concentrations supérieures à 50 mg pour 100 ml : mesure spectrophotométrique de la densité optique à 540 mμ de l'échantillon dilué à l'aide de carbonate de sodium à 1 %.

Les études immunologiques portent sur différents antigènes érythrocytaires étudiés avant et après congélation sont en cours. Les premiers résultats seront donnés dans le présent ouvrage.

Méthode de congélation et décongélation :

Le sang est recueilli stérilement sur mélange anticoagulant A.C.D, si possible en flacons stériles et apyrogènes de capacité : 25, 50, 125, 250, 500 ml.

1 - La glycérolation :

Le sang est centrifugé et déplasmatisé.

On ajoute alors en goutte à goutte, avec agitation constante un volume égal au culot globulaire d'une solution de glycérol à 40 %.

Le flacon est laissé 15 minutes à +4° C.

Le sang glycérolé est ensuite mis en paillettes.

Les paillettes une fois remplies sont bouchées à l'aide du ciment et sont mises à tremper dans un bain de soluté NaCl 9‰ pendant 30 minutes.

Ce laps de temps écoulé, on essuie les paillettes soigneusement et on les met à +4° C pendant 15 minutes.

2 - Congélation :

Les paillettes, par paquet de 7 à 8, attachées entre elles par un élastique sont mises dans les gobelets plastiques.

L'immersion se fait en 2 temps :

On tient le gobelet d'abord : 8 minutes dans les vapeurs d'azote, juste au dessus du niveau liquide, puis immersion totale du panier qui prend sa place dans un canister.

3 - La décongélation :

Le gobelet est tiré par sa tige métallique et les paillettes sorties du panier sont mises immédiatement à tremper dans un bain d'eau à 40° C pendant 2 minutes exactement. Le gobelet avec le reste des paillettes congelées, non utilisées est remis dans l'azote.

Chaque paillette est ensuite essuyée soigneusement et vidée dans un tube à hémolyse.

La sortie du panier de l'azote liquide n'entraîne pas la décongélation de toutes les paillettes situées dans ce gobelet parce que celui-ci reste rempli d'azote.

4 - La déglycérolation :

Le volume de sang recueilli est doublé avec une solution de glycérol à 10 %. Bien mélanger avec douceur - On centrifuge le tube 4 mm à 2 500 T.

Le surnageant est pipeté et remplacé par une solution de sorbitol à 8 %.

2 volumes de solution pour 1 volume de culot globulaire après agitation douce : centrifuger 2 mm à 2 500 T. Puis rejeter le surnageant.

Ajouter autant de NaCl à 0,9 % que le tube peut en contenir - Bien mélanger - Centrifuger 2 mm à 2 500 T/mn.

Selon la couleur du surnageant, on fera un ou 2 lavages supplémentaires en NaCl à 0,9 %.

Les hématies seront ensuite remises en suspension dans une solution de NaCl à 0,9 % à la concentration désirée.

Le glycérolage et la mise en paillettes prenant à peu près 20 minutes.

La décongélation et la déglycérolation demandent une trentaine de minutes.

On doit insister, lors de la glycérolation sur la rapidité des manipulations qui permet un meilleur rendement de la technique.

De même il importe de souligner que le rendement de la méthode et les résultats observés en ce qui concerne le comportement des hématies déglycérolées sont d'autant meilleurs que la manutention du sang a été plus soigneuse et le délai de conservation à 4° C avant la congélation a été plus bref.

Si l'on désire traiter les hématies par une enzyme (Broméline Trypsine..) il n'est pas nécessaire d'effectuer toutes les manipulations indiquées ci-dessus.

On fera agir l'enzyme après le premier lavage en NaCl à 0,9 % puis on lavera les hématies traitées selon la méthode habituelle, ces lavages éliminant à la fois l'enzyme et le glycérol.

Résultats

1 - Etude des hématies :

Etude des hématies après décongélation, déglycérolation et lavages :

La morphologie des globules sur frottis colorés ou à l'état frais paraît normale.

La résistance globulaire aux solutions salines hypotoniques (faite sur 20 échantillons) est sensiblement normale (voir courbe).

2 - Etude de l'hémoglobine présente dans les surnageants :

Après décongélation le taux d'hémoglobine présente dans le liquide en suspension varie entre 50 et 150 mg/100 ml.

A chaque lavage, on retire une quantité décroissante d'hémoglobine.

Généralement le surnageant obtenu après le deuxième lavage en solution NaCl à 0,9 % a une concentration en hémoglobine inférieure à 10 mg pour 100 ml.

3 - Les premières études faites sur les antigènes érythrocytaires avant et après congélation sont satisfaisantes et ne montrent pas de modifications des phénotypes érythrocytaires.

DISCUSSION

Dès l'expérimentation, cette technique nous a semblé présenter de nombreux intérêts :

Le pourcentage de récupération cellulaire est bon - (rendement supérieur à 95 %).

Les manipulations sont rapides et faciles.

Les paillettes utilisées sont incassables et résistent parfaitement aux changements de température enregistrés lors de la congélation-décongélation.

Le contenu d'une paillette permet d'obtenir environ un volume de 10 ml de suspension globulaire à 2 % ce qui est généralement suffisant pour le travail sérologique d'une journée.

D'autre part grâce aux différentes couleurs et à la facilité de marquage de ces paillettes, nous pouvons aisément reconnaître et identifier chaque échantillon.

Le système de rangement des échantillons d'hématies-tests mis au point au C.D.T.S permet d'utiliser au maximum l'espace réfrigéré qu'est l'azote liquide et représente un avantage non négligeable de cette technique.

CONCLUSIONS

Nous décrivons une méthode de conservation des hématies-tests par congélation dans l'azote liquide.

Le glycérol est l'agent protecteur à la concentration intracellulaire de 20 %.

La récupération cellulaire, quantitative et qualitative, est bonne. C'est une méthode pratique qui permet un stockage facile d'hématies-tests.

- DISCUSSION -

Nous venons de décrire 2 méthodes de conservation par congélation des hématies.

Avant de comparer nos résultats à ceux fournis par la littérature, nous allons rappeler les effets des basses températures sur des hématies non protégées.

Un sang porté sans préparation au-dessous de 0°C s' hémolyse.

La congélation lente d'un flacon de sang entraîne la formation de cristaux, au début formés uniquement à partir de l'eau présente dans le mélange.

Ces cristaux sont d'abord extra cellulaires puis plus tardivement intra-cellulaires.

A partir du point eutectique du mélange qui est de -22°C , les cristaux alors formés sont de composition identique à celle du liquide restant formé d'eau et de sel.

La formation des cristaux de glace pendant la congélation semble avoir plusieurs effets :

- Action mécanique directe sur le globule rouge : les cristaux, exerçant une force de cisaillement sur la cellule, provoquent sa destruction.

Bien que non prouvé, cet effet semble exister mais n'est pas suffisant à rendre compte de l'hémolyse, les expériences imitant ce traumatisme ne donnent pas d'arguments positifs.

- Un des résultats principaux de la congélation est celui de la déshydratation extra cellulaire puis secondairement intra cellulaire.

Parallèlement à la déshydratation, il se produit une augmentation de la concentration en électrolytes dont le taux atteint rapidement un seuil toxique pour la cellule - Lovelock (21) a souligné l'effet dénaturant de cette hypertonicité sur les complexes lipoprotéiques de la membrane du globule rouge.

Dans un tel contexte biologique, certains auteurs comme DOEBLER et RINFRET (11) émettent l'hypothèse d'un déséquilibre dans l'hydratation de la membrane cellulaire, aggravant encore la lésion de l'érythrocyte.

- Enfin, il est bien évident que la formation de cristaux intra-cellulaires modifie la structure interne du globule rouge et va entraîner certains dysfonctionnements.

La cessation inégale des réactions chimiques lors du refroidissement, entraîne alors l'accumulation de certains produits intermédiaires dégradés. L'étude de ces divers phénomènes a donc conduit plusieurs auteurs à rechercher des solutions au problème de la conservation des hématies par congélation.

Nous ne nous étendrons pas sur les premières expériences faites avec du sang desséché ou sur les méthodes utilisant les hautes pressions permettant ainsi une congélation sans cristallisation.

Ces techniques ont un intérêt théorique mais ne sont pas applicables pratiquement.

Par contre, l'utilisation de protecteurs intra ou extra cellulaires, associée à une congélation lente ou rapide a donné des résultats extrêmement intéressants.

Nous classons les méthodes ainsi mises au point en 2 groupes suivant que l'additif est intra ou extra cellulaire.

I - ADDITIFS INTRA CELLULAIRES

A - Utilisation du glycérol

a) on a commencé à utiliser le glycérol comme protecteur cellulaire avec les observations empiriques de PARKES(25) sur les protections des semences animales, contre les effets détériorants de la congélation-décongélation par les alcools polyédriques.

SMITH la même année, démontre une absence de lyse des cellules rouges dans les biopsies testiculaires ainsi protégées.

b) Les polyalcools agiraient :

- En diminuant le point de congélation du mélange,
- en diminuant le nombre de molécules d'eau congelable,
- en évitant la survenue d'une hyperconcentration électrolytique intra-cellulaire toxique.

c) Le glycérol, le premier employé, est un trialcool, stable, de coût peu élevé et libre de toute toxicité.

- Il a la propriété de pénétrer rapidement à l'intérieur de l'érythrocyte.
- Son emploi nécessite après décongélation pour rétablir l'équilibre osmotique des lavages répétés devant abaisser à moins de 2 gr la quantité totale de glycérol contenue dans un flacon de sang au moment de la transfusion.

d) Selon la concentration optimale intra-érythrocytaire, on distingue 2 modes de congélation :

- La congélation dite lente, avec abaissement progressif et non contrôlé de la température de refroidissement du sang.

Dans ces conditions, la concentration intra érythrocytaire du glycérol doit être élevée, comprise entre 40 et 50 %.

- La congélation dite rapide, qui utilise comme milieu réfrigérant, l'azote liquide.

La concentration intra érythrocytaire de glycérol est beaucoup plus basse, de l'ordre de 17 à 18 %.

1 - METHODES DE CONGELATION LENTE

a) on décrira d'abord la méthode préconisée par TULLIS (Protein foundation) et collaborateurs (30), remaniée par ZEMP et SPROUL (27)

Méthode : la Congélation.

Ce procédé utilise le fractionnateur de COHN, qui permet de séparer le plasma des globules et simultanément de procéder à la glycérolation du culot globulaire en circuit stérile.

A l'heure actuelle, le fractionnateur de COHN est remplacé par un bol centrifugeur A.D.L, qui diminue le temps des manipulations.

- La glycérolation se fait en 2 temps pour éviter la perte cellulaire importante observée avec des solutions initiales titrées à 50 % de glycérol et attribuée à un gonflement trop rapide de la cellule avant équilibration avec le glycérol.

Le premier glycérolage utilise 300 cc d'une solution titrée à 20 % de glycérol. Le deuxième glycérolage, 1 000 cc d'une solution à 50 % de glycérol, ces solutions étant toutes deux équilibrées en lactate de sodium, chlorures de potassium et magnésium.

Au total, la concentration intra-érythrocytaire du glycérol, à la fin de la congélation est comprise entre 40 et 50 %.

Le temps de préparation du sang est de 45 minutes environ.

Les pertes, lors de la congélation, sont minimales.

Différentes températures de stockage ont été étudiées, la température de -80° C a donné les meilleurs résultats.

La décongélation : Après un délai de plusieurs mois, elle se fait en quelques minutes dans un bain à 40° C.

Les hématies sont alors déglycérolées, par lavage continu.

Les solutions de lavages sont :

Solution de glycérol à 10 % équilibrée en lactate de sodium et chlorure de potassium.

Solution de lactate de sodium en chlorure de potassium.

Solution saline physiologique.

3 à 4 litres de solutions sont nécessaires.

Le culot est ensuite remis en suspension, soit dans le plasma d'origine conservé congelé, soit dans une solution d'albumine à 5 %.

RESULTATS :

Le taux d'hémolyse enregistré est inférieur à 10 % et la quantité d'hémoglobine surnageante dans le liquide de suspension avant injection est comprise entre 40 et 50 mgr pour 100 ml.

Les hématies ainsi traitées présentent chez le receveur une survie normale et bon nombre de transfusions ont été ainsi faites avec des résultats cliniques satisfaisants.

Les quelques cas d'hémoglobinurie avec quelquefois insuffisance rénale aiguë ont pu être rapportés à des solutions instables d'albumine.

La durée de conservation par un tel procédé est très longue (expériences sur 6 ans).

Enfin : les hématies, congelées, décongelées et lavées peuvent être conservées à +4° C huit jours avant l'injection.

Au total : la méthode de TULLIS et Collab. donne de bons résultats.

Mais elle nécessite un appareillage coûteux, non accessible à toutes les banques du sang.

D'autre part, le temps nécessaire aux opérations de glycérolation et déglycérolation est trop important.

b) Procédé de HUGGINS (Chelsea Naval Hospital) (14)

Méthode : la Congélation

Le sang pris sur la solution anticoagulante A.C.D. est centrifugé et déplasmatisé.

Le culot globulaire subit un seul glycérolage avec une solution de glycérol à 79 % équilibrée en glucose 8 %, Fructose 1 %, E.D.T.A 0,3 % et eau distillée.

L'addition d'E.D.T.A à la solution de glycérol prévient l'apparition de réactions de Coombs positives sur les hématies, pouvant être expliquées par la faible concentration ionique du milieu de protection.

Le glycérolage se fait dans les proportions suivantes :

- 1 volume de culot globulaire pour un volume de solution de glycérol.

Au total : la concentration intra érythrocytaire du glycérol avoisine celle donnée par la méthode de TULLIS.

Les hématies ainsi traitées sont mises à une température de -80° C et congelées lentement dans un sac plastique de grande contenance qui permettra ainsi la déglycérolation.

La Décongélation :

Se fait par immersion du sac dans un bain à 40° C.

La déglycérolation ne nécessite pas de centrifugation.

Elle se fait par cytoagglomération (à cause de l'absence d'électrolytes dans les solutions) et dilution.

L'appareil utilisé est un cytoagglomérateur.

Les solutions de lavages sont constituées par des solutés glucosés hypertoniques (50 %) et par du sérum physiologique.

- 3 lavages sont nécessaires utilisant 3 à 4 litres de solutions.

Avant injection : une centrifugation permettra d'enlever le dernier surnageant.

Temps de manipulation : 30 minutes.

Résultats : Les premières expériences montraient que pour un culot globulaire ainsi traité, les pertes enregistrées étaient supérieures à 20 %.

- L'hémoglobine surnageante dans le liquide de suspension avant injection comprise entre 100 et 400 mg pour 100 ml.

- La survie des cellules injectées, étudiée chez le receveur, 24 h après injection de 85 % à 90 %.

- Les hématies congelées et décongelées de cette manière et gardées à +4° C pendant 6 jours présentent une augmentation de l'hémoglobine surnageante supérieure à 400 mg pour 100 ml.

Si elles sont alors transfusées leur survie est de 70 %.

Au total : C'est une méthode simple, avec un seul glycérolage. D'autre part, des transferts multiples lors des lavages sont évités.

Les premiers résultats ont été décevants, à l'heure actuelle il semble y avoir une bonne récupération cellulaire après décongélation.

- Par ailleurs, le coût de la méthode est élevé.

2 - METHODE DE CONGELATION RAPIDE

a) en 1962, PERT (23) utilise le glycérol à des concentrations intra-érythrocytaires finales faibles en congelant les hématies en azote liquide.

Le maximum de viabilité cellulaire est trouvé avec une concentration intra cellulaire de 17,5 % de glycérol.

La congélation rapide est obtenue en plongeant les hématies glycérolées en azote liquide, les containers étant des récipients en aluminium ou des poches en Téflon.

Après décongélation, on utilise pour les lavages une solution de sucre à 30 %, remplaçant le glycérol sans hémolyse excessive.

Les études de survie au Cr^{51} des cellules ainsi traitées injectées, varient entre 85 et 95 %.

Mais certains accidents rénaux ont été rapportés aux solutions hypertoniques de sucrose.

b) KRIJNEN (de la Croix Rouge Hollandaise) a repris, en la modifiant, cette méthode. (17, 18, 19).

Technique de congélation :

Le sang collecté sur A.C.D, est centrifugé et déplasmatisé.

Le plasma est gardé à -30°C .

On additionne, volume à volume, au culot globulaire une solution de NaCl 9‰ contenant :

Du glycérol 35 % et sorbitol 4 %.

La concentration intra érythrocytaire de glycérol est donc de 17,5 %.

Les cellules glycérolées sont transvasées dans des containers stériles, ultra plats, en aluminium inoxydable, à fermeture hermétique, que l'on remplit complètement.

Les containers sont placés verticalement dans une cuve remplie d'azote liquide.

Le temps de congélation est de 2,5 minutes.

La Décongélation :

Se fait dans un bain à 40°C .

Aidée par agitation manuelle douce des containers elle dure 2 minutes.

Le sang décongelé est transvasé dans un flacon de 500 ml.

Après centrifugation, on enlève le surnageant et on commence les lavages :

1er lavage : solution de sorbitol 16 % en NaCl 9‰, 2ème et 3ème lavages en solution saline physiologique.

Le culot est ensuite remis en suspension dans son plasma et prêt à être injecté.

Résultats :

Les pertes enregistrées, lors de la congélation et décongélation sont très peu importantes : De l'ordre de 2 % au total d'après les auteurs.

Les lavages en sorbitol sont très efficaces puisqu'il reste moins de 1 gr de glycérol pour 500 ml dans le sang reconstitué.

Les études portant sur les propriétés métaboliques et enzymatiques, sur résistance osmotique des globules ainsi traités donnent de très bons résultats, de même leur survie mesurée in vivo au chrome 51 qui est de 28 à 30 jours.

Un culot congelé, décongelé et lavé peut être gardé à +4° C pendant 3 semaines, sans qu'on observe de changement vital au niveau cellulaire.

Au total :

Méthode simple et efficace.

Mais le problème des containers reste posé :

- En aluminium inoxydable avec des inconvénients certains
- Poches en Téfon d'un prix d'achat très élevé.

B) Utilisation du diméthylsulfoxyde ou (D.M.S.O)

LOVELOCK et BISHOP, les premiers, ont montré que le D.M.S.O protégeait les cellules contre les effets de la congélation.

HUGGINS (13) a mis au point une méthode de congélation des globules rouges :

- où le D.M.S.O est utilisé comme protecteur cellulaire.
- la congélation est "lente" - La température de stockage est à -80° C.

a) le D.M.S.O

De formule $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$ se présente sous la forme d'un corps pur, sans couleur et sans odeur.

Exposé à l'air et à la lumière, il se gonfle d'eau et prend une couleur jaune et une odeur désagréable.

Il traverse très rapidement la membrane cellulaire et se répartit régulièrement de part et d'autre de la cellule.

Sa toxicité éventuelle pour l'homme l'a fait écarté de la congélation du sang à usage transfusionnel.

On l'utilise à l'heure actuelle pour la congélation d'hématies-tests.

b) Méthode de congélation :

On ajoute à un volume de globules rouges déplasmatisés un volume de solution protectrice composée de :

Sucrose : 10 %

D.M.S.O : 8,6 M en eau distillée.

Le mélange se fait en goutte à goutte avec agitation constante.

Les hématies ainsi traitées sont stockées à une température de -80°C dans des sacs plastiques ou des récipients métalliques.

La décongélation se fait par immersion dans un bain à 40°C .

Plusieurs lavages sont effectués soit au sérum physiologique, soit à l'aide de solutions hypertoniques de glucose en milieu pauvre en électrolytes, utilisant ainsi le phénomène de cytoagglomération des hématies.

c) Résultats

L'hémolyse est inférieure à 5 %.

La conservation à -80° peut être de plusieurs années.

Au total : Une bonne méthode de congélation d'hématies-tests, avec un équipement et des manipulations simples.

II - ADDITIFS EXTRA-CELLULAIRES

Le but idéal d'une méthode de congélation serait de pouvoir disposer de flacons à décongeler pouvant être transfusés dans l'immédiat.

Pour cela, il faut éviter tout lavage lors de la décongélation.

La congélation ultra rapide, préconisée par les travaux de LUYET (22), associée à l'utilisation d'un additif protecteur extra-cellulaire a ainsi éveillé beaucoup d'intérêt.

1 - P.V.P. ou polyvinylpyrrolidone (subtosan)

- Substance macromoléculaire de P. M = 40 000.
- A l'heure actuelle, on dispose d'une autre P.V.P de P.M = 27 000
- mais l'incertitude règne quant au devenir et à l'excrétion de cette substance dans l'organisme et un éventuel stockage du P.V.P dans le système réticulo-endothélial pourrait être à l'origine d'insuffisance hépatique. Aussi la quantité totale de P.V.P reçue au cours de la vie d'un sujet ne doit-elle pas dépasser 47 gr.

a) Travaux de RINFRET : Méthode

Le P.V.P est utilisé seul ou associé à de l'albumine, la combinaison des deux substances permettant une réduction de la concentration en P.V.P.

Il est ajouté à un certain volume de sang complet. Le mélange est congelé dans des containers en aluminium.

L'appareil de congélation est le B.P.U (Blood Processing Unit) de l'Union Carbide, permettant une congélation en 60 à 75 secondes dans l'azote liquide.

La décongélation se fait par immersion dans un bain à + 40° avec agitation, en 60 à 75 secondes.

Le sang est prêt alors à être injecté.

Résultats - Caractéristiques du sang décongelé

- L'hémoglobine du surnageant, le jour de la décongélation est de l'ordre de 1 500 à 3 000 mg.

- le K extra-cellulaires est élevé (16 m Eq/l)

- Le taux de P.V.P est de 35 gr pour un flacon de sang.

Chez le receveur : après transfusion de sang ainsi traité :

- La survie des hématies, 24 h après la transfusion est de 82 à 85 %.

- Après injection de 2 unités de sang à un receveur (soit 70 gr de P.V.P au total), on retrouve dans le sérum, 10 à 15 mg pour 100 ml de P.V.P 6 mois après

Des modifications ont été apportées à cette méthode pour diminuer le taux de P.V.P et réduire l'hémolyse (ex. lavages).

b) Le C.T.R.A "Jean JULLIARD" étudie depuis 1963 l'emploi des solutions macromoléculaires à l'aide du B.P.U pour la congélation de sang (12).

Les premiers essais ont été fait avec des solutions chlorurées sodiques à 2 % de PVP dont les concentrations finales ne dépassent pas 7 %.

Le pourcentage de cellules intactes est de 98 % mais on note une résistance osmotique nettement diminuée.

A l'heure actuelle : pour retrouver l'utilisation de telle méthode pour congeler du sang à usage transfusionnel, le C.T.R.A étudie une solution de :

- P.V.P 35 % + glycérol 19 % en solution chlorure sodique hypotonique,
- 1 volume de cette solution pour 2 volumes de sang A.C.D complet.

On remarque alors :

- Une diminution du K extra-cellulaire (= 6 m Eq/l)
- une hémoglobine libre : 200 mq %

Mais là encore, les lavages post-décongélation sont nécessaires et ce qui est gagné en viabilité cellulaire est perdu d'un autre côté en manipulations. Au total : méthode encore en expérimentation non applicable pour l'instant à la congélation du sang à usage transfusionnel.

2 - Action protectrice des sucres

Certains sucres sont encore utilisés à la congélation d'hématies-tests. Citons la méthode de STRUMIA, (28) l'addition à des globules rouges de sucres, jointe à une congélation très rapide permet la conservation des hématies à l'état congelé.

On mélange à parties égales le sang prélevé sur A.C.D et la solution suivante :

- Dextrose anhydre 15 gr
- Lactose monohydraté 10 gr
- H₂O q.s.p. 100 ml

La mixture est répartie dans des containers métalliques très plats, fabriqués spécialement à cet usage.

La congélation se fait en moins d'une minute par immersion dans l'azote liquide.

La décongélation est aussi rapide par immersion du flacon métallique dans un bain à 40° C.

On peut rapprocher de cette technique, la méthode de HUNSTMAN (15).

Le sang est prélevé sur E.D.T.A ou A.C.D - moins de 2 h avant la congélation, on mélange 1 volume de saccharose à 40 % et 2 volumes de sang.

A l'aide d'une pipette, on fait tomber une à une des gouttes de sang dans un tube contenant l'azote liquide. Les gouttes congèlent immédiatement. Les perles de sang ainsi formées sont placées dans des boîtes et conservées dans l'azote liquide.

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

La décongélation est rapide, en jetant quelques perles dans un tube contenant une solution physiologique de NaCl à 40°.

Ces méthodes présentent un inconvénient certain :

L'importance de l'hémolyse à la décongélation (supérieure à 10 %.)

- CONCLUSION -

Dans le travail que nous venons de présenter, deux méthodes de conservation des hématies par congélation, mises au point au C.D.T.S sont décrites.

La première méthode, essentiellement destinée au sang à usage transfusionnel., utilise le glycérol comme agent protecteur à la concentration intra-cellulaire de 40 %. La congélation est lente, sans contrôle de vitesse de refroidissement. La température de stockage est de -85° C.

L'élimination du glycérol, après décongélation, est facilitée par l'emploi de solutions hypertoniques de sorbitol.

Les hématies destinées aux transfusions et conservées par congélation doivent satisfaire certains critères précis :

- conservation des caractères morphologiques, osmotiques et biochimiques de la cellule.

- Survie normale in vivo, chez un receveur compatible, d'au moins 70 % des hématies transfusées.

- Le produit injecté doit être stérile, apyrogène et non toxique.

- La méthode employée doit être si possible :

 - rapide

 - simple

 - d'un coût relativement peu élevé.

Les résultats obtenus par notre technique montrent que :

- Les hématies déglycérolées ont une morphologie normale, et une résistance osmotique analogue à celle d'hématies prélevées sur solution anticoagulante A.C.D et conservées à 4° C moins de 8 jours.

- Les activités enzymatiques et les caractères antigéniques de ces hématies sont peu modifiés par la congélation et la déglycérolation.

Le rendement de la méthode est supérieur à 95 %.

Le dosage du glycérol après lavages et remise en suspension des hématies congelées montre un taux inférieur à 2 gr par litre.

Un sang décongelé et lavé, peut être gardé 8 jours à 4° C sans augmentation de l'hémoglobine surnageante.

La viabilité des hématies injectées marquées par le radiochrome 51 est satisfaisante.

Plus de 85 % des cellules sont en circulation 24 h après l'injection. La survie de ces hématies par la suite est normale.

De nombreuses transfusions ont été faites avec du sang congelé, décongelé et déglycérolé de cette façon.

Les résultats cliniques ont toujours été excellents.

Le matériel indispensable à la technique se réduit à un congélateur à -80° C.

La deuxième méthode exposée est, pour l'instant, seulement destinée aux hématies-tests.

Le glycérol est utilisé à la concentration intra-cellulaire de 20 %.

La préparation des hématies avant congélation consiste en un seul glycérolage.

Le sang glycériné est ensuite réparti dans des paillettes en chlorure de polyvinyle (précédemment utilisées pour la congélation de semences animales.)

La congélation se fait par immersion des paillettes dans l'azote liquide en deux temps. Elle demande 8 mn.

Les paillettes congelées sont conservées dans l'azote liquide.

La décongélation est rapide : en 2 minutes dans un bain d'eau à 40° C.

Les lavages, comme pour la première méthode, utilisent des solutions hypertoniques de sorbitol pour déplacer le glycérol.

- Une morphologie cellulaire associée à une résistance osmotique aux solutions salines hypotoniques normales.

- Un taux d'hémoglobine dans le surnageant avant remise en suspension inférieur à 10 mg pour 100 ml.

- Le rendement de la méthode est en règle générale supérieur à 95 %.

- Les premières études portant sur les antigènes érythrocytaires avant et après congélation sont satisfaisantes.

C'est un procédé de congélation simple et rapide, le matériel utilisé est facile à se procurer.

Comparées aux nombreuses méthodes étudiées dans la littérature, les deux techniques exposées représentent une étape dans la recherche des moyens simples de conservation prolongée du sang.

Elles ont l'avantage d'être utilisables dans l'immédiat dans tous les centres de transfusion.

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1 - BOULLENE J.C, ANDRE A., BROCTEUR J. et OTTO-SERVAIS M :

Application à la conservation d'hématies-tests d'une technique utilisée en insémination artificielle. (Méthode des paillettes).

Congrès - Hématologie Strasbourg 23-28 août 1965.

- 2 - CASSOU R.

Comptes rendus des séances de la société de biologie.

144 p 486-487 (1950)

- 3 - CASSOU R.

Extr. du procès verbal de la séance du 10 juin 1964, de l'Académie d'Agriculture de France.

- 4 - COHEN P. and GARDNER F.H :

Platelet preservation II. Preservation of canine platelet concentrates by freezing in solutions of glycérol plasma.

J. Clin. Invest. 41 1962 p 10-19

- 5 - COMBRISSEON A., LAFOREST J., CHAMPCOMMUNAL A., PANNETIER C.

Conservation des hématies par congélation en présence de glycérol et de sorbitol.

Procédé de conservation et résultats préliminaires.

Revue Française de Transfusion 1968 XI n° 1 p 7-22.

- 6 - COMBRISSEON A.

Conservation des hématies, en particulier des hématies de phénotypes rares.

6ème congrès Int. de Transfusion Sang. Tours 1966.

- 7 - COMBRISSEON A., GERBAL A., LIBERGE G., SEGER J., LOPEZ M., CHAMPCOMMUNAL A., SALMON CH.

Technique de conservation des hématies-tests par congélation à -85° C. Résultats concernant les phénotypes de groupes sanguins et les phénotypes d'enzymes.

Revue Française de Transfusion 1969.

- 8 - COMBRISSE A.
La conservation des hématies par congélation.
Bulletin I.N.S.E.R.M 1969.
- 9 - CROSBY W.H and FURTH F.W
A modification of the method for measurement of hemoglobin in plasma and urine.
Blood 1956, 11, 380.
- 10 - DACITE J.V
Practical Haematology.
2nd Ed. Churchill London 1954.
- 11 - DOEBLER G.F. and RINFRET A.P.
The influence of protective compounds and cooling and warming conditions on hemolysis of erythrocytes by freezing and thawing.
Biochim, biophys, Acta 68 1962 p449-458.
- 12 - EYDONNET J.P., FORT V., SIBLANCARD J., GINESTE J., MONTEUX J., THIERCELIN P.C.,
MIGNE J., BERROCHE L.Y., MAUPIN B.
Premier bilan d'une expérience de conservation du sang aux basses températures utilisant le procédé LINDE.
Annales Congr. Europ. International de Transfus. Sanguine 1966.
- 13 - HUGGINS C.E.
Prevention of hemolysis of large volumes of red blood cells slowly frozen and thawed in the presence of dimethyl sulfoxide.
Transfusion (Philadelphia)
1963, 3, p 483-493
- 14 - HUGGINS C.E.
Frozen blood : Theory and practice
J.A.M.A 1965, 193, p 941-944.
- 15 - HUNTSMAN R.G, HURN B.A.L, IKIN E.W, LEHMANN H, LIDDELL J.
Blood groups of human red cells after two years storage in liquid nitrogen.
Transfusion (Philadelphia)
1964 4 p 354-360.

- 16 - KETCHELL M.M., TULLIS J.L., FINCH R.J., PRISCOLL S.G and SURGENOR D.L.
Use of biochemical equipment for the long term preservation of erythrocytes.
J.A.M.E.R. MED. Ass. 168
1958 p 404-408
- 17 - KRIJNEN H.W., DEWIT J.J. Fr. M. KUIVENHOVEN A.C.J, LOOS J.A, PRINS H.K.
Glyceroltreated Human red cells frozen with liquid nitrogen.
Vox sang
1964, 9 p 559-572.
- 18 - KRIJNEN H.W, J.J. Fr. M;DEWIT, KUIVENHOVEN A.C.J and REYDEN G.V.D.
Freezing of red cells with liquid nitrogen.
Pro 10th cong. int. Blood Transfusion Stockholm.
1964-1965 p 683-687 et p 687-691
- 19 - KRIJNEN H.W, J.j. Fr. M. DEWIT, KUIVENHOVEN A.C.J.
Intermediate rate freezing of human red cells.
Transfusion T. IX n° 1
1966 p 53-60
- 20 - LAFOREST J. et COMBRISSE A.
Dosage du glycérol et du sorbitol dans le sang comportement de ces polyalcools au contact des hématies.
Rev. Française de Transfusion
1968 XI n° 1 p 23-32
- 21 - LOVELOCK J.E.
Denaturation of lipid protein complexes as cause of damage by freezing.
Proc. Roy. Soc. London S B 147
P 427-433 (1957)
- 22 - LUYET B.J. and P.M. GEHENIO
Life and death at low temperatures, Normandy, Missouri.
Biodynamica 1940.

23 - PERT J.H, SHORK P.K, and MORE R.

A new method of low temperature blood preservation using liquid nitrogen and glycerol sucrose additive.

Clin. Res. 11 - 197

1963

24 - PERT J.H, SHORK P.K and MORE R.

Low temperature preservation of human erythrocytes ; Biochemical and Clinical aspects.

IXth Congr. Int. Soc. of Blood Transfusion

Mexico 1962 p 42-53

XVIIIth Scientific meeting of the protein foundation 1963

25 - POLGE C, SMITH A.V, and PARKES A.S.

Revival of spermatozoa after nitrification and dehydriatation at low temperatures.

Nature London

1949 164 p 666

26 - SALMON CH. et COMBRISSE A.

Conservation à -85° C. d'une réserve d'hématies de phénotypes rares.
Rev. Française de Transfusion 1969.

27 - SPROUL M.T and ZEMP J.W.

Methodology and solution preparation for glycerolized erythrocytes.

Vox Sang 7

1962 p 103-106

28 - STRUMIA M.M, COLWELL L.S, STRUMIA P.V, MAWR B.

The preservation of blood for transfusion.

IV - In vitro recovery after freezing and thawing of red cells modified with sugars

V - Post transfusion survival of red cells modified with sugars, frozen and stored in the frozen state.

J. Lab. Clin. Med. 56 1960

p 576-686

587-593

29 - STRUMIA P.V, STRUMIA M.M, COLWELL L.S, TORG B.

Agglutinability of red cells after long term storage in the frozen state.

Transfusion (Philadelphia)

1962 2 p 31-35

30 - TULLIS J.L

Editorial - Transfusion

Transfusion - Philadelphia

1963 - 3 - p 155-160

31 - VALERI C.R.

- Frozen Blood

- Frozen blood concluded

The new England Journal of Medicine

1966 (7) 275 p 365-373

(8) 275 p 425-431

32 - VALERI C.R. and ALMOND DOUGLAS V.

The in vivo effects of the glycerolized agglomerated erythrocytes transfused in multiple units to stable anemie patients.

Transfusion (Philadelphia)

33 - VALERI C.R, RUNCK A.H, MC CALLUM L.E.

Observations on autologous previously frozen deglycerolized, agglomerated, resuspended red cells.

Transfusion (Philadelphia)

1967 1 p 105-116

Vu, le Président de Thèse

Monsieur le Professeur R. ANDRE

Vu, le Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur J. LOYGUE

Vu, et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris.

